

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

⑫ 公開特許公報(A) 平4-5242

⑬ Int. Cl.⁵

A 61 K 37/14
9/08
9/127
9/50

識別記号

ABZ

庁内整理番号

8317-4C
7624-4C
7624-4C
7624-4C
7624-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)1月9日

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全7頁)

⑮ 発明の名称 人工血液

⑯ 特 願 平2-107946

⑰ 出 願 平2(1990)4月24日

⑱ 発 明 者 吉 岡 浩 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内
⑱ 発 明 者 坂 口 圭 介 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内
⑱ 発 明 者 緒 方 嘉 貴 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内
⑱ 発 明 者 後 藤 彰 久 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内
⑲ 出 願 人 テ ル モ 株 式 会 社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

明 細 書

1. 発明の名称

人工血液

2. 特許請求の範囲

(1) 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する膜集防止剤を、前記疎水性部が脂質膜に固定され、かつ親水性高分子鎖部が膜表面から外方向に延出するよう修飾されたヘモグロビン内包リポソームを、

人工的に製造された水溶性高分子化合物を主成分とする血漿増量剤の水溶液中に懸濁せしめてなることを特徴とする人工血液。

(2) 前記膜集防止剤がポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質である請求項1記載の人工血液。

(3) 前記水溶性高分子化合物の平均分子量が2万〜7万である請求項1または2に記載の人工血液。

(4) 前記水溶性高分子化合物がヒドロキシエチルデンプンである請求項1ないし3のいずれかに記載の人工血液。

(5) 投与すべき生体が許容する品質浸透圧に調整されてなる請求項1ないし4のいずれかに記載の人工血液。

(6) 投与すべき生体が許容する膠質浸透圧に調整されてなる請求項1ないし5のいずれかに記載の人工血液

(7) 電界質組成が血漿と実質的に等しいものである請求項1ないし6のいずれかに記載の人工血液。

(8) 電界質組成がリンゲル液、乳酸リンゲル液またはクレブスーリンゲル液と実質的に等しいものである請求項1ないし6のいずれかに記載の人工血液。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、医療分野において、大量出血患者の救命治療に使用される、人工的に調整された酸素運搬能を有する救命用輸液、すなわち人工血液に関する。

〔従来の技術〕

生体の血管内における血液量の維持には、血漿コ

ロイドである血漿蛋白質が重要な役割を果たしていることが知られている。このため、従来より、生体の血液とほぼ等しい膠質浸透圧を有する血漿増量剤を補液することにより、患者の出血性ショックを回復させる手法がとられてきた。しかしながら、循環血液量の30%以上が出血した場合には、抹消組織への酸素供給が不十分となるため、血漿増量剤の投与のみでは不十分であり、さらに酸素運搬体を投与する必要がある。

このような酸素運搬体としては、従来、天然赤血球を含有する天然血液あるいは赤血球濃厚液が用いられてきた。しかしながら、これらを使用する場合には、抗原抗体反応による凝血を回避するため、供血者と受血者の血液型を一致させなければならず、そのために各種血液型の血液を保存する必要があり、過剰のストックを必要とし、またその交差過性試験が繁雑であるために、緊急時に対応することが困難である場合が生じる。しかも、このような天然血液あるいは赤血球濃厚液は、その有効保存期間が3週間(4℃)と短い。また凍結保存によって長期保存

ングリコール共重合体をヘモグロビンと結合させて修飾し、循環血流中におけるヘモグロビンの滞留時間を延長させた代用血液も開示されている(特公平2-6337号公報)。しかしながら、この代用血液においても、ヘモグロビンの滞留時間は十分ではなく、しかも、修飾ヘモグロビンの濃度を上げると、その水溶液の粘性が極端に上昇し、膠質浸透圧が著しく過剰となるために、修飾ヘモグロビンの濃度はせいぜい6%が上限であり、この程度の濃度では、酸素運搬能力が十分であるとはいえなかった。

これらの欠点を克服するものとして、脂質2分子膜からなるリボソームの内層にヘモグロビンを内包したヘモグロビン内包リボソームの検討が行われている(特開昭52-151718、特開昭58-183625、特開昭61-37735号公報)が、このようなヘモグロビン内包リボソームの懸濁液は、膠質浸透圧が極端に低いため、これらを生体の血管に投与しても循環血液量の維持あるいは増量効果はほとんど期待できなかった。

上記の欠点を克服するものとして、ヘモグロビン

可能とした凍結血液も使用されているが、コスト高であったり、また長期保存によって、使用の際に、浸透圧ショックに対して、赤血球が脆弱になっているために溶血しやすいという問題がある。さらに、これらの天然血液や赤血球濃厚液を投与する場合には、肝炎やエイズ等の感染症の発生も懸念される。

このような問題を解決するため、フルオロカーボン乳化製剤からなる人工酸素運搬体の研究が行われている(特公昭60-33367号公報)が、この人工酸素運搬体は、その酸素運搬能力をフルオロカーボンへの酸素の物理的溶解現象のみに依存しているため、酸素運搬能力が不十分であり、使用は酸素の高い分圧を施すことができるような状況に限られている。また、フルオロカーボンが、生体内における自然免疫系を妨害する虞れがあること、さらには、生体内においてフルオロカーボンが十分に代謝されないため、循環血流中から消失した後も長期に渡って生体内に残存する問題も指摘されている。

また、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールあるいはエチレングリコール-プロピレ

内包リボソームを血漿増量剤の水溶液中に懸濁することにより、酸素運搬能力と血漿増量効果の両方を兼ね備えた人工血液が開示されている(米国特許4,133,874号公報)が、この人工血液においては、ヘモグロビン内包リボソームが血漿増量剤の水溶液中で凝集する傾向があるため、懸濁液の粘度が高くなり、静注投与がしにくいものであった。さらには、リボソームの凝集が顕著な場合には、生体内に投与した際にリボソームの凝集塊が血管内で栓塞し、生体を死に至らしめる危険性もあった。

[発明が解決しようとする課題]

本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであって、酸素運搬能力と血漿増量効果の両方を兼ね備え、しかも酸素運搬能力を有するヘモグロビン内包リボソームが血漿増量剤水溶液中において凝集せず、このため生体に静注投与しても安全で、大量出血患者の救命に有効な人工血液を提供することを目的とする。

[課題を解決するための手段]

上記の課題を解決するため、本発明に係る人工血

液は以下の構成を有する。

- (1) 一端に疎水性部を有し、かつ他端に親水性高分子鎖部を有する凝集防止剤を、前記疎水性部が脂質膜に固定され、かつ親水性高分子鎖部が膜表面から外方向に延出するよう修飾されたヘモグロビン内包リポソームを、

人工的に製造された水溶性高分子化合物を主成分とする血漿増量剤の水溶液中に懸濁せしめてなることを特徴とする人工血液。

- (2) 前記凝集防止剤がポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質である前記(1)記載の人工血液。

- (3) 前記水溶性高分子化合物の平均分子量が2万～7万である前記(1)または(2)記載の人工血液。

- (4) 前記水溶性高分子化合物がヒドロキシエチルデンプンである前記(1)ないし(3)のいずれかに記載の人工血液。

- (5) 投与すべき生体が許容する品質浸透圧に調整されてなる前記(1)ないし(4)のいずれかに記載の人工血液。

蛋白を使用した場合には、エイズをはじめとする各種感染症発生の危険性や、血漿製剤の不足、あるいは経済的な問題等が危惧される。このため、人工的な代用血漿で対応できる場合には、可能な限りこれを使うことが望ましく、従って、血漿増量剤としては人工的に製造された水溶性高分子化合物を用いることが望ましい。このような水溶性高分子化合物としては、アカシアゴム、修飾ゼラチン、ポリビニルピロリドン、デキストラン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルデンプンなどが挙げられる。

このような血漿増量剤の分子量は、人工血液の膠質浸透圧を投与すべき生体が許容する浸透圧に調整する必要があるために、十分大きくなければならない。しかしながら、血漿増量剤の分子量が大きすぎると、人工血液の粘度が高くなって容易に静注投与できなかつたり、あるいはヘモグロビン内包リポソームを凝集させやすいという問題がある。従って、血漿増量剤の平均分子量は20,000～70,000が好ましく、より好ましくは30,000～40,000である。

工血液。

- (6) 投与すべき生体が許容する膠質浸透圧に調整されてなる前記(1)ないし(5)のいずれかに記載の人工血液。

- (7) 電界質組成が血漿と実質的に等しいものである前記(1)ないし(6)のいずれかに記載の人工血液。

- (8) 電界質組成がリンゲル液、乳酸リンゲル液またはクレブスリンゲル液と実質的に等しいものである前記(1)ないし(6)のいずれかに記載の人工血液。

ヘモグロビン内包リポソームおよびその製造方法は、既に、特開昭52-151758号、同58-183625号、同61-37735号、同62-178521号、同63-209746号、同63-211230号、同63-275522号、同64-61426号、同64-75418号、特開平1-180245号公報に開示されている。

本発明の人工血液においては、血漿増量剤としては、種々公知のものが用いられえが、天然の血漿

000である。

また、このような水溶性高分子化合物の水溶液中の濃度は、上述のような分子量においては、0.3～4.0 g/ml程度が好ましい。この範囲を上まわる場合には、人工血液の粘度が高くなって容易に静注投与できなかつたり、ヘモグロビン内包リポソームを凝集させやすいという問題がある。また、この範囲を下まわると、実質的に膠質浸透圧を生体が許容する範囲に調整することが難しくなる。

種々の水溶性高分子化合物を比較すると、同程度の平均分子量においては、ヒドロキシエチルデンプンが最もヘモグロビン内包リポソームを凝集させにくく、従って最も生体に対する安全性が高く好ましい。

本発明の人工血液を得るには、ヘモグロビン内包リポソームの水懸濁液に、血漿増量剤の水溶液を添加・混合してもよいし、あるいはヘモグロビン内包リポソームの水懸濁液に、血漿増量剤の原料粉末を添加・溶解してもよい。

一般に、リポソームは天然の血漿中や人工的な血

増量剤中では凝集する傾向がある。この凝集反応は可逆的なものではあるが、リボソームが凝集した懸濁液は粘度が高く、静注投与が困難であったり、凝集したリボソームを生体血管に投与すれば、リボソームの凝集塊が血管内で栓塞し、生体を死に至らしめる虞れがある。従って、大量出血患者に対して使用される酸素運搬能を有する人工血液を構成するヘモグロビン内包リボソームは、血漿増量剤中において凝集しないことが要求される。このような血漿増量剤水溶液中のリボソームの凝集反応は、リボソームを構成する脂質膜の表面と血漿増量剤分子との相互作用により、リボソーム表面に血漿増量剤分子が吸着することによって引き起こされるものと推測される。

本発明者らは、先に、一端に疎水性部を有し、他端に親水性高分子鎖部を有する凝集防止剤（蛋白質吸着抑制剤）をリボソーム表面に固定することにより、生体の血管に投与した際におけるリボソームの凝集を抑制する技術について出願した（特願平01-63507号、特願平01-284912号）が、

0モルが望ましく、より望ましくは40～200モルである。この範囲を下まわる場合には、人工血液中でのヘモグロビン内包リボソームの凝集防止効果が発現され難く、この範囲を上まわる場合にはPEG結合天然リン脂質の水溶性が高くなり、リボソーム膜中に固定され難くなる。

PEGとリン脂質を共有結合するには、リン脂質の極性部に反応活性を有する官能基が必要である。この官能基としては、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基、ホスファチジルグリセロールの水酸基、ホスファチジルセリンのカルボキシル基等があり、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基が好ましく利用される。

リン脂質の官能基とPEGを共有結合させるには、塩化シアヌルを用いる方法、カルボジイミドを用いる方法、酸無水物を用いる方法、グルタルアルデヒドを用いる方法等がある。ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とPEGとを結合させるには、塩化シアヌル（2,4,6-トリクロロ-s-トリアジン）を用いる方法が好ましい。例えば、モノメト

さらにこの凝集防止剤が、人工的な血漿増量剤水溶液中におけるリボソームの凝集をも効果的に防止できることを知見し、本発明を完成させたものである。

本発明に係る人工血液には、これらに開示されている凝集防止剤はいずれも使用することができるが、その中でも、毒性が低い点から、ポリエチレングリコール結合水素添加天然リン脂質（以下、PEG結合天然リン脂質という）を用いることが好ましい。

PEG結合リン脂質は、水素添加リン脂質の親水部にポリエチレングリコール（PEG）を共有結合させた構造を有し、1分子中に1又は複数のPEG鎖を含有する。PEG鎖のリン脂質と結合していない側の末端は、水酸基あるいはメチル、エチル等の短鎖のエーテル、酢酸、乳酸等の短鎖のエステルであってもよい。

ここで、天然リン脂質としては、大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルエタノールアミン等を用いることが好ましい。

本発明の目的のためには、PEG結合天然リン脂質分子中のPEG鎖長は、平均重合度で5～100

キシポリエチレングリコールと塩化シアヌルを公知の反応操作で結合させることにより、2-O-メトキシポリエチレングリコール-4,6-ジクロロ-s-トリアジン（活性化PEG1）または2,4-ビス（O-メトキシポリエチレングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化PEG2）が得られる。これらとアミノ基を脱塩酸縮合反応により結合させることで、ホスファチジルエタノールアミンの極性頭部にPEGを共有結合させたリン脂質が得られる。ここで、活性化PEG1を用いた場合には、一分子中のリン脂質に1本のPEG鎖を、活性化PEG2を用いた場合には、2本のPEG鎖を含有することになる。また、モノメトキシPEGと無水コハク酸を反応させてPEG末端にカルボキシル基を導入し、これとホスファチジルエタノールアミンをカルボジイミド存在下で反応させることにより、アミド結合を介したPEG結合天然リン脂質が得られる。

PEG結合天然リン脂質を脂質層に固定したリボソームを製造するには、PEG結合天然リン脂質を

リポソーム形成脂質と予め均一に混合して、得られた混合脂質を用いて常法によりリポソームを形成せればよい。この場合、リポソーム形成脂質とPEG結合天然リン脂質の混合比は、主成分であるリン脂質に対して、モル比で0.1~50モル%、好ましくは0.5~20モル%、より好ましくは1~5モル%とされる。この範囲を下まわる場合には、人工血液中でのリポソーム凝集防止効果が不十分となり、この範囲を上まわる場合には、PEG結合天然リン脂質の可溶化能により、ヘモグロビン内包リポソームが不安定となる。また、得られた混合脂質を用いて内層にヘモグロビンを含有するリポソームを形成するには、通常一般的に行われているリポソーム化の方法に従って行うことができる。またリポソーム形成脂質も、公知のものが用いられ、例えば、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン等に代表されるリン脂質で卵黄、大豆その他の天然材料に由来するもの、または有機化学的な合成手段により得られるものを単独でまたは混合して

い程度、すなわち生体が許容する品質浸透圧に調整されていることが望ましく、具体的には250~350 mOsm/L、より望ましくは280~310 mOsm/Lの範囲で選択される。

本発明の人工血液においては、その膠質浸透圧が、生体の正常な膠質浸透圧に比べて低すぎる場合には、循環血液量の維持あるいは増量効果が不十分となり、また高すぎる場合には血管内への水分の流入が過剰となり、血管外の細胞が脱水状態になる虞れがある。天然の血液においても、膠質浸透圧は一定ではなく、また固体差もあるが、本発明の人工血液においては、その膠質浸透圧が、健康人に投与することにより、生体に対して危害を及ぼさない程度、すなわち生体が許容する膠質浸透圧に調整されていることが望ましく、具体的には10~40 mmHg、より望ましくは15~30 mmHgの範囲で選択される。

本発明の人工血液においては、その電解質組成が、生体の血液中の正常な電解質組成と大きく異なる場合には、生体の正常な生理機能が阻害される虞れがあるので、電解質組成を生体の血液中の正常な電解

主成分とすることができる。さらに膜安定化剤としてコレステロール、コレスタノール等のステロール類や、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、高級脂肪酸等を添加してもよい。

リポソーム膜中におけるPEG結合天然リン脂質の存在状態は明らかではないが、PEG結合天然リン脂質の疎水性部がリポソーム膜中の疎水性領域内にあって、親水性のPEG鎖が親水性領域から膜外の水溶性媒体中にかけて存在しているものと推定される。

このようにして得られたPEG結合天然リン脂質の人工血液中の濃度は0.1~1.0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ が好ましい。

本発明の人工血液においては、その品質浸透圧が、生体の正常な品質浸透圧に比べて低すぎたり高すぎたりした場合には、生体の天然赤血球を破壊・溶血する虞れがある。天然の血液においても、品質浸透圧は一定ではなく、また固体差もあるが、本発明の人工血液においては、その品質浸透圧が、健康人に投与することにより、生体に対して危害を及ぼさな

質組成と実質的に等しく、あるいはリンゲル液、乳酸リンゲル液またはクレブスリンゲル液と実質的に等しく調整することが好ましい。

次に実施例および比較例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

[実施例]

モノメトキシポリエチレングリコール5,000 (PEG 5K, ユニオンカーバイド社製) 100g を1,2-ジクロロエタン500mlに溶解し、さらに無水コハク酸10gとピリジン8mlを加えて、窒素気流下にて3日間沸点還流した。濾過、エバポレーション後、200mlの蒸留水に溶解し、エーテルで水相を洗浄した後、クロロホルム200mlに抽出した。エバポレーション後、エタノール400mlに溶解し、ヘキサン9mlに再沈精製した。濾過、真空乾燥して片末端カルボキシPEG 5Kを85.6g得た。これを30gと、水素添加大豆ホスファ

チジルエタノールアミン7g、さらにジシクロヘキシルカルボジイミド1.8gを蒸留直後のクロロホルム50mlに加熱溶解し、50℃で終夜反応させた。濾過後、エバポレーションしてエタノールに溶解、不溶物を濾去して、溶液をヘキサンの再沈した。濾集、真空乾燥して、PEG結合水素添加大豆リン脂質(HSPE-PEG5K)34gを得た。得られたHSPE-PEG5Kの生理食塩水溶液をマウスに静脈投与してそのLD50を求めたところ、11g/kg体重であり、極めて毒性が低いことが示された。

水素添加大豆レシチン126g、コレステロール64g、ミリスチン酸10gをジクロロメタン400mlに溶解し、エバポレーションにより有機溶媒を除去した。得られた混合脂質に50%ヘモグロビン水溶液1000mlを加え、振盪混合後、500kg/cm²の圧力でフレンチプレス処理を10回繰り返した。得られたフレンチプレス処理液を生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離(17,000r.p.m、30分)し、沈殿リボソームを生理

(サリンヘス、杏林製薬(株)製)中に再懸濁させた。このリボソーム懸濁液を光学顕微鏡(400倍)により観察したところ、1μmを超えるリボソーム凝集物は全く認められなかった(サンプル3:実施例)。

サンプル1, 2, 3の品質浸透圧および膠質浸透圧を測定したところ表1の結果を示した。

表1

サンプル No	品質浸透圧 mOsm/l	膠質浸透圧 mmHg
1	290	0
2	290	18.6
3	290	18.6

なお、品質浸透圧および膠質浸透圧の測定は、それぞれ浸透圧計Model 3C2(アドバンス社製)、コロイド浸透圧計4400(米国ウェスコ社製)を用いて行った。

食塩水により、さらに遠心洗浄を2回繰り返した。洗浄後の沈殿リボソームをヘモグロビン濃度で10%となるように生理食塩水中に懸濁させた(サンプル1:比較例)。得られたリボソームの平均粒径は0.2μmであった。このリボソーム懸濁液を遠心分離処理(17,000r.p.m、30分)し、沈殿リボソームをヘモグロビン濃度で10%となるように平均分子量30,000~40,000のヒドロキシエチルデンプンの6%生理食塩水溶液(サリンヘス、杏林製薬(株)製)中に懸濁させた(サンプル2:比較例)。この懸濁液を光学顕微鏡(400倍)にて観察したところ、リボソームは完全に凝集し、その凝集物の大きさは50μmを超えるものであった。サンプル1の300mlに、5%のHSPE-PEG5Kを含む生理食塩水12mlを加え、室温で3時間放置した後、生理食塩水により10倍に希釈して遠心分離(17,000r.p.m、30分)し、沈殿リボソームをヘモグロビン濃度で10%となるように、平均分子量30,000~40,000のヒドロキシエチルデンプンの6%生理食塩水溶液

<血液交換実験>

さらに、サンプル1, 2, 3を用い、家兎の高度血液交換実験を行った。血液交換実験は、家兎の大腸動脈より腹大動脈に挿入したカテーテルより25ml/kg、20ml/kg脱血し、その度に等量の人工血液を投与した。最後に同様に20ml/kg脱血し、40ml/kgの人工血液を投与して85%以上の血液を人工血液と交換した。その後24時間にわたり家兎の状態観察を行った後、計画屠殺し、剖検および組織病理学的検索を行った。

ヘモグロビン内包リボソームを生理食塩水に分散したサンプル1投与例では、膠質浸透圧の不足が原因とみられる脱水、貧尿症状が交換直後より発生し、状態は経時的に悪化し、約8時間後に死亡した。また、血漿増量剤中におけるヘモグロビン内包リボソームの凝集を回避していないサンプル2では、投与後も特に状態は悪化せず24時間生存したが、剖検の結果、肺にヘモグロビン内包リボソームの凝集による血管栓塞が引き起こしたと思われる出血が見られ、病理学的検索からは、リボソーム凝集塊による

肺、腎臓における血管内凝固 (Intravascular-Coagulation, I. C) 像が観察された。また血漿増量剤中でも凝集を起こさないサンプル3投与例においては、投与後24時間にわたり状態は安定し、剖検および病理学的検索からも著変は観察されなかった。

[発明の効果]

以上、詳述したように、本発明の人工血液は、酸素運搬能と血漿増量効果の両方を兼ね備え、しかも、酸素運搬能を有するヘモグロビン内包リポソームが、血漿増量剤中において凝集しないので、粘度が低く、生体内への投与が容易であり、また凝集物が毛細血管内で栓塞することがなく安全で、大量出血患者の救命に有効である。

また、凝集防止剤としてPEG結合水素添加天然リン脂質を使用した場合には、その静注毒性が極めて低いので、大量投与しても安全で、しかも天然血漿中でのヘモグロビン内包リポソームの凝集も防止するので、投与後もヘモグロビン内包リポソームが血管内で凝集する虞れがない。

さらに、本発明の人工血液では、晶質浸透圧を生体が許容しうる範囲に調整してなるため、溶血毒性を回避することができ、また膠質浸透圧を生体が許容しうる範囲に調整してなることにより、適度の血漿増量効果を付与することができる。

出願人 テルモ株式会社

代理人 弁理士 岩出昌利